



# **Duração da receptividade de fêmeas de cochonilhas- algodão (Hemiptera; Pseudococcidae) e a sua relação com a hipótese de poliandria**

**Cristina Pedraz Sanz**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientador: Professor Doutor José Carlos Franco Santos Silva  
Co-orientadora: Doutora Elsa Maria Borges da Silva

**Júri:**

Presidente: Doutor António Maria Marques Mexia, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Teresa Ferreira Ramos Nabais Oliveira Rebelo, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa;

Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Elsa Maria Borges da Silva, Bolseira de Pós-Doutoramento.

Lisboa, 2010

## **Agradecimentos**

Agradeço inicialmente ao Senhor Professor José Carlos Franco Doutor do Instituto Superior de Agronomia, meu orientador, pelo incentivo, dedicação, ensino e compreensão.

À Doutora Elsa Borges da Silva por todo o apoio, sugestões, revisão do trabalho escrito e ensinamentos prestados ao longo destes meses de trabalho.

À Engenheira Vera Zina e Joana Prieto pela ajuda prestada na realização de este trabalho e pelo companheirismo.

Me gustaría agradecer también a todos los buenos profesores que tuve en mi paso por la Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro como en el Instituto Superior de Agronomia, especialmente al Profesor Fernando Martins, por su constante apoyo y amistad.

Agradezco especialmente a mi familia, principalmente a mis padres, hermanas y abuelos, por vuestra confianza, comprensión y cariño.

A mis amigos, tampoco hubiera sido posible sin vosotros, por todo el ánimo y amistad mostrada.

Y por último te lo agradezco a ti, André, por toda la fuerza y amor dado.

## Resumo

O presente trabalho teve como objectivo estudar alguns aspectos da biologia reprodutiva das fêmeas das cochonilhas-algodão, *Planococcus citri* e *Pseudococcus calceolariae*, nomeadamente: a hipótese de poliandria; o período de receptividade das fêmeas após cópula; o efeito da cópula na atractividade das fêmeas, relativamente aos machos; e o efeito do acasalamento com vários machos na fecundidade das fêmeas, como possível vantagem da poliandria.

Para o efeito, foram realizados diversos ensaios biológicos em placas de Petri e olfactómetro de ar estático. Os resultados mostraram que as fêmeas de ambas as espécies podem acasalar com mais do que macho (pelo menos cinco, no caso de *P. calceolariae*), em condições de laboratório. Após a cópula, pelo menos, algumas das fêmeas de *P. citri* mantiveram-se receptivas até 24h depois, com um máximo estimado de cerca de 29h. A atractividade das fêmeas não foi afectada pela cópula, mesmo ao fim de 24h, sugerindo que esta não inibe a emissão de feromona. A taxa de acasalamento de *P. citri* diminuiu em função do tempo decorrido após a cópula. O aumento do número de cópulas efectuadas por fêmeas não teve efeito na fecundidade de *P. calceolariae*.

Palavras-chave: poliandria; fecundidade; sistema de acasalamento; cochonilhas-algodão, *Planococcus citri*; *Pseudococcus calceolariae*;

## Abstract

This work was aimed at studying some aspects of the reproductive biology of the mealybug females, in *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae*, namely: the hypothesis of polyandry; the period of female receptivity after mating; the effect of mating on the female attractiveness to the males; the effect of multiple mating with different males on the fecundity, as a possible advantage of polyandry.

Thus, several bioassays were carried out in Petri dish arenas and static air olfactometer. The results showed that the females of both mealybug species are able to copulate with more than one mate (at least five, in the case of *P. calceolariae*), in laboratory conditions. At least some *P. citri* females were still receptive 24h after mating, with an estimated maximum of about 29h. The female attractiveness was not affected by mating, even 24h after, suggesting that the pheromone emission was not inhibited. The mating rate of *P. citri* decreased in function of the time period since copulation. The increase of mate number per female had no effect on *P. calceolariae* fecundity.

Key words: polyandry, fecundity, mating system, mealybugs, *Planococcus citri*, *Pseudococcus calceolariae*

## Extende abstract

This work was aimed to study at studding some aspects of the reproductive biology of the mealybug females, in *Planococcus citri* and *Pseudococcus calceolariae*, namely: the hypothesis of polyandry; the period of female receptivity after mating; the effect of mating on the female attractiveness to the males; the effect of multiple mating with different males on the fecundity, as a possible advantage of polyandry.

The study of polyandry was carried out by exposing *P. citri* virgin mature males to 5-days old virgin females in Petri dish arenas (1 couple per arena) up to 1h period, until mating. After copula, each female was mated again 0,5h, 1,5h, 2,5h, 3,5h, 8h, 16h and 24h after first mating. Each modality was replicated 50 times. The time until courtship, the duration of courtship and copula, as well as the number of oviposited eggs per female were registered.

The effect of mating on female attractiveness was evaluated in static-air olfactometer in dual choice tests, with 50 replicates. Each *P. citri* male was submitted to one of the following combinations: virgin female versus mated female, 0,5 h after copula; virgin female versus mated female, 3,5 h after copula virgin female versus mated female, 24h after copula.

The effect of multiple matings with different males on the fecundity was studied, by comparing the number of eggs oviposited by *P. calceolariae* females mated with 1, 2, 3, 4 or 5 different males, with 40 replicates.

The results showed that the females of both mealybug species are able to copulate with more than one mate (at least five, in the case of *P. calceolariae*), in laboratory conditions. At least some *P. citri* females were still receptive 24h after mating, with an estimated maximum of about 29h. The female attractiveness was not affected by mating, even 24h after, suggesting that the pheromone emission was not inhibited. The mating rate of *P. citri* decreased in function of the time period since copulation. The increase of mate number per female had no effect on *P. calceolariae* fecundity.

Key words: polyandry, fecundity, mating system, mealybugs, *Planococcus citri*, *Pseudococcus calceolariae*

## Índice

Índice de figuras .....	vii
Índice de quadros .....	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Sistema de acasalamento dos insectos .....	3
2.1.1.Machos .....	3
2.1.2.Fêmeas .....	6
2.2. Mecanismos que controlam a receptividade.....	7
2.3. Custos e benefícios da poliandria .....	9
2.3.1.Longevidade.....	9
2.3.2.Fecundidade .....	10
2.3.3.Fertilidade .....	12
2.3.4.Genética.....	12
2.4. Poliandria .....	13
3. Material e métodos .....	14
3.1. Criação das cochoilhas .....	14
3.2. Isolamento .....	15
3.3. Poliandria e período de receptividade das fêmeas após cópula .....	16
3.3.1.Até 3,5 horas após cópula.....	16
3.3.2.Até 24 horas após cópula.....	17
3.4. Efeito da cópula na atractividade das fêmeas relativamente aos machos .....	18
3.5. Efeito dos acasalamentos múltiplos na fecundidade .....	19
3.6. Análise estatística .....	19
4. Resultados.....	22
4.1. Poliandria .....	22
4.2. Período de receptividade das fêmeas após cópula .....	22
4.2.1.Até 3,5 horas após cópula.....	22
4.2.2.Até 24 horas após cópula.....	23
4.2.3.Estimativa do período de receptividade.....	26
4.3. Efeito da cópula na atractividade de fêmeas relativamente aos machos.....	27
4.4. Efeito dos acasalamentos múltiplos na fecundidade .....	28
5. Discussão .....	30

6. Conclusões .....	33
---------------------	----

## Índice de figuras

<b>Fig. 1.</b> Esquema de criação de cochonilhas-algodão em laboratório, ilustrando as duas fases de criação (Silva, 2008). .....	14
<b>Fig. 2.</b> Caixas de isolamento de <i>Planococcus citri</i> (Risso) .....	16
<b>Fig. 3.</b> Cópula de <i>Planococcus citri</i> (Risso) (12x) .....	17
<b>Fig. 4.</b> Postura de <i>Planococcus citri</i> (Risso) .....	17
<b>Fig. 5.</b> Olfactómetro de ar estático.....	18
<b>Fig. 6.</b> Postura de <i>Pseudococcus calceolariae</i> (Maskell) .....	19
<b>Fig. 7 –</b> Percentagem de acasalamientos com produção de ovos em função do tempo decorrido após a primeira cópula, em fêmeas de <i>Planococcus citri</i> (Risso) expostas a machos, em placa de Petri, durante 1h; as colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ( $P>0,05$ ) .....	22
<b>Fig. 8 –</b> Tempo até ao início da cópula (barra preta), duração da corte (barra branca) e duração da cópula (barra cinzenta) ( $\pm$ erro-padrão), no segundo acasalamento, em função do tempo decorrido entre a primeira e a segunda cópula (0,5h, 1,5h, 2,5h e 3,5h), na espécie <i>Planococcus citri</i> (Risso). Modalidade 0,5h, N = 17; modalidade 1,5h, N = 20; modalidade 2,5h, N = 17; e modalidade 3,5h, N = 9 .....	23
<b>Fig. 9 –</b> Percentagem de acasalamientos com produção de ovos, em função do tempo decorrido após a primeira cópula, em fêmeas de <i>Planococcus citri</i> (Risso) expostas a machos, em placa de Petri, durante 1,5 h; as colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ( $P>0,05$ ) .....	24
<b>Fig. 10 –</b> Número médio ( $\pm$ erro-padrão) de ovos postos por fêmea de <i>Planococcus citri</i> (Risso) na segunda cópula, em do tempo decorrido entre estas .....	25
<b>Fig. 11 –</b> Tempo até o início da corte (barra preta), duração da corte (barra branca) e duração da cópula (barra cinzenta) ( $\pm$ erro-padrão) em função da primeira e segunda cópula (cor preta e vermelha) e do tempo decorrido entre os mesmos (8, 16, 24h) na espécie <i>Planococcus citri</i> (Risso); primeira cópula: modalidade 8h, N = 15; modalidade 16h, N = 6; .....	26



## Índice de quadros

<b>Quadro 1.</b> Exemplos de espécies ou grupos de insectos associados a cada sistema de acasalamento dos machos (adaptado de Thornhill & Alcock 2001) .....	5
<b>Quadro 2.</b> Exemplos de espécies ou grupos de insectos associados a cada sistema de acasalamento das fêmeas (adaptado de Thornhill e Alcock 2001).....	7
<b>Quadro 3.</b> Mecanismos que controlam a receptividade da fêmea (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mousseau, 2002, Thornhill & Alcock 2001) .....	8
<b>Quadro 4.</b> Mecanismos que influenciam a longevidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mosseau, 2002, Thornhill & Alcock 2001) .....	10
<b>Quadro 5.</b> Mecanismos que influenciam a fecundidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000, Kaspi & Parella, 2008, Rolff & Siva-Jothy, 2002) .....	11
<b>Quadro 6.</b> Mecanismos que influenciam a fertilidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000) .....	12

---

## 1. Introdução

As cochonilhas-algodão (Hemiptera, Pseudococcidae) assumem importância económica por incluir várias espécies com estatuto de praga. Os estragos provocados pela actividade alimentar e excreção de melada das suas populações, tendencialmente concentradas em frutos em fase de crescimento, traduzem-se na queda, descoloração e deformação dos frutos, bem como na diminuição do seu calibre (estragos directos) ou pela formação de fumagina, devido à deposição de melada (estragos indirectos) (Franco et al., 2000).

*Planococcus citri* (Risso) é uma das espécies de cochonilha-algodão que tem assumido estatuto de praga nos citrinos, encontrando-se em mais de 70 países. *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) é referida como podendo ser localmente importante em alguns países como Itália, França, Austrália ou Nova Zelândia. Em Portugal, estas duas cochonilhas são pragas dos citrinos, sendo *P. citri* a espécie de pseudococcídeos mais frequente no Algarve e *P. calceolariae* nos distritos de Setúbal, Santarém e Coimbra (Franco et al., 2000).

Morfologicamente, *P. citri* e *P. calceolariae* apresentam, à semelhança de outras espécies de cochonilhas, elevado dimorfismo sexual. As fêmeas adultas são neoténicas (*i.e.*, morfologicamente semelhantes a ninfas, mas com maturidade reprodutiva), ápteras, de corpo ovalado e achatado dorsoventralmente, com 0,4 a 0,8 mm de comprimento. Pesam cerca de 100 a 200 vezes mais do que os machos e podem crescer e alimentar-se continuamente até à postura. Os machos por sua vez, sobrevivem apenas por alguns dias, e são alados, de corpo estreito e alongado, com as três regiões do corpo bem definidas e deixam de se alimentar no final do segundo instar ninfal (Franco et al., 2000, 2009).

No que diz respeito ao ciclo de vida das cochonilhas-algodão, é comum a machos e fêmeas até ao segundo instar ninfal, diferenciando a partir daí. No final do segundo instar, os machos iniciam formação de um casulo constituído por filamentos cerosos, no interior do qual completarão mais dois estádios, pré-pupa e pupa. Após a emergência, os machos adultos permanecem no interior de casulo durante o tempo necessário à formação de um par de filamentos cerosos caudais e à conclusão da esclerotização do tegumento (Franco et al., 2000). Durante este período, completam a maturidade sexual e ficam aptos a voar, a responder à feromona sexual emitida pelas fêmeas e a acasalar (Franco et al., 2009). As fêmeas, por sua vez, completam mais um instar ninfal até atingirem o estado adulto e, embora estejam aptas a reproduzir-se logo após a emergência, só atingem a plena

---

maturidade ao fim de alguns dias (Franco et al. 2000). A postura dos ovos inicia-se, em geral, cerca de 3-7 dias após o acasalamento, em condições de laboratório (Elsa Borges da Silva et al., dados não publicados). Os ovos são envolvidos por um ovissaco, ou saco ovífero, de natureza cerosa que visa a ligação ao substrato e a protecção dos ovos e das ninfas recém-eclodidas contra inimigos naturais, dissecação e melada (Franco et al., 2000, 2009).

A presente dissertação de Mestrado insere-se no âmbito do projecto PTDC/AGR-AAM/099560/2008 “Biologia reprodutiva de cochonilhas-algodão e interacções mediadas por feromonas: fundamentos para o desenvolvimento de tácticas de protecção de base ecológica”, financiando pela FCT. Tendo por base o estudo da biologia reprodutiva das cochonilhas-algodão e das relações parasitóide-hospedeiro (ambas mediadas por feromonas), este projecto visa criar os fundamentos necessários para o desenvolvimento de tácticas de protecção de sólida base ecológica. A aplicação dos princípios resultantes do conhecimento adquirido sobre a biologia reprodutiva dos machos de cochonilhas-algodão pode criar as bases para a redução efectiva das populações destas pragas, através de tácticas que originem a eliminação dos machos (e.g., captura em massa, atracção e morte), ou subvertam o seu potencial reprodutivo (e.g., confusão sexual).

Assim, tendo como ponto de partida os resultados obtidos em ensaios realizados anteriormente, que mostraram que as fêmeas de *P. citri* se mantinham receptivas, pelo menos, durante 3,5h após o acasalamento, sugerindo a hipótese de existir poliandria nestas cochonilhas (Elsa Borges da Silva et al., dados não publicados), pretendeu-se estudar alguns aspectos da biologia reprodutiva das fêmeas, utilizando como modelo as espécies *P. citri* e *P. calceolariae*, nomeadamente com o objectivo de:

1. Avaliar a hipótese de poliandria;
2. Determinar o período de receptividade das fêmeas após a cópula;
3. Determinar o efeito da cópula na atractividade das fêmeas, relativamente aos machos;
4. Determinar o efeito do acasalamento com vários machos na fecundidade das fêmeas, como possível vantagem da poliandria.

---

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Sistemas de acasalamento nos insectos

#### 2.1.1. Machos

A maioria dos machos é poligâmica, uma vez que podem inseminar várias fêmeas. No entanto, existem igualmente machos monogâmicos. A classificação dos sistemas de acasalamento, que se apresenta seguidamente, foi adaptada de Thornhill & Alcock (2001), com base na terminologia mais recente (e.g., Peixoto et al., 2008; Schlüns et al., 2009) (Quadro 1):

**I. Monoginia** - os machos copulam com uma só fêmea durante cada ciclo de reprodução. Este sistema pode ser dividido em dois subgrupos:

- A. Monoginia de defesa da fêmea (“Mate guarding monogamy”) - o macho mantém-se ligado a uma só fêmea, para prevenir que outros machos possam copular com ela;
- B. Monoginia de assistência à fêmea (“Mate assistance monogamy”) - o macho mantém-se ligado a uma só fêmea, para assegurar a sua descendência.

Em algumas espécies, é possível encontrar estes dois tipos de monoginia combinados.

**II. Poliginia** - sistema de acasalamento em que os machos copulam com mais do que uma fêmea, durante o seu período de vida:

- A. O potencial de monopolização de fêmeas pelo macho é sobretudo devido à distribuição agregada das fêmeas ou dos recursos atractivos para estas
  - a. Poliginia de defesa das fêmeas (“Female defence polygyny”) - os machos evitam o acesso de outros machos a grupos de fêmeas ou a séries de fêmeas isoladas;
  - b. Poliginia de defesa de recursos (“Resource defense polygyny”) - os machos evitam o acesso de outros machos, defendendo os recursos que atraem as fêmeas receptivas, ou que obtiveram ou prepararam para as fêmeas.

---

B. Baixo potencial de monopolização de fêmeas pelo macho, devido à sua dispersão

a. Poliginia de dominância ou do tipo “lek” (“Pure dominance or lek polygyny”) - alguns machos ganham acesso às fêmeas, através da exclusão de outros machos de territórios simbólicos de acasalamento, preferidos por fêmeas selectivas; podem ser locais onde historicamente ocorrem as cópulas ou locais na periferia, onde os recursos estão dispersos;

b. Poliginia de competição (“Scramble competition polygyny”) - os machos não fazem esforço por defender um território específico de acasalamento, mas tentam antecipar-se aos competidores, no acesso às fêmeas receptivas;

- Poliginia de reunião (“Explosive mating assemblage”) - as fêmeas receptivas são abundantes durante um curto período de tempo;

- Poliginia de procura escalonada de fêmeas (“Prolonged searching polygyny”) - as fêmeas receptivas não podem ser monopolizadas devido à sua grande dispersão ou ao elevado nível de competição entre machos.

O sucesso reprodutivo dos machos é usualmente determinado pela capacidade de fazer a corte e copular com várias fêmeas, mas também depende da capacidade de transformar essas cópulas em fertilizações (Harmer et al., 2006). Tudo isto é influenciado pelas variáveis ecológicas que determinam a probabilidade de um macho copular com mais do que uma fêmea. Estas variáveis incluem a proporção de machos sexualmente activos disponível em cada momento e a distribuição espacial e temporal das fêmeas receptivas. Se a proporção sexual é dominada pelos machos durante a respectiva esperança de vida, então nessa situação os machos têm vantagens em serem monogâmicos. Por outro lado, se os machos não conseguem encontrar fêmeas disponíveis, no tempo e no espaço, então têm vantagens em manter-se permanentemente ligados à primeira fêmea que encontrarem. A monogamia neste caso também é mais vantajosa. (Thornhill & Alcock 2001).

**Quadro 1.** Exemplos de espécies ou grupos de insectos associados a cada sistema de acasalamento dos machos (adaptado de Thornhill & Alcock, 2001).

Sistemas de acasalamento	Ordem	Familia	Género / Espécie
<b>I. Monoginia</b>			
<b>A. Monoginia de defesa da fêmea</b>	Isoptera Hymenoptera Diptera	Ceratopogonidae	Térmitas Abelhas Alguns mosquitos ceratopogónideos
<b>B. Monoginia de assistência à fêmea</b>	Isoptera Diptera  Coleoptera	Ceratopogonidae  Scarabaeidae	Térmitas Alguns mosquitos ceratopogónidos Alguns escaravelhos do género <i>Phanaeus</i>
<b>II. Poliginia</b>			
<b>A. O potencial de monopolização de acasalamento pelo macho é sobretudo devido à distribuição agregada das fêmeas ou de recursos atractivos para as fêmeas</b>			
<b>a. Poliginia de defesa das fêmeas</b>	Coleoptera  Hymenoptera	Cerambycidae  Crabonidae	<i>Hoplocerambyx spinicornis</i> <i>Philanthus bicinctus</i> <i>Crataerina pallida</i>
<b>b. Poliginia de defesa de recursos</b>	Diptera Hymenoptera  Hemiptera  Odonata	Hippoboscidae Megadiilidae  Coreidae  Libellulidae	<i>Anthidium maculosum</i> <i>Acanthocephala femorata</i> <i>Plathemis lydia</i>
<b>B. Baixo potencial de monopolização de acasalamento do macho devido à dispersão das fêmeas</b>			
<b>a. Poliginia de dominância ou do tipo "lek"</b>	Hymenoptera  Hymenoptera	Pompilidae  Apidae	<i>Hemipepsis ustulat</i> <i>Eulaema meriana</i> <i>Physiphora demandata</i>
<b>b. Poliginia de competição</b>	Diptera Hymenoptera  Odonata  Odonata	Ulidiidae Vespidae  Libellulidae  Coenagrionidae	<i>Abispa ephippium</i> <i>Plathemis lydia</i> <i>Enallagma hageni</i>
- Poliginia de reunião			
- Poliginia de procura escalonada de fêmeas			

---

### 2.1.2. Fêmeas

Thornhill & Alcock (2001) classificam os sistemas de acasalamento das fêmeas de acordo com o respectivo número de cópulas ao longo do período de vida. A classificação que se apresenta seguidamente (Quadro 2) foi adaptada de Thornhill & Alcock (2001), mas adoptando terminologia que tem vindo a ser utilizada por outros autores (e.g., Arnqvist et al., 2000; Arnqvist, G. & Andrés, J.A. 2006):

I. **Monandria** - as fêmeas copulam uma só vez, durante cada ciclo de reprodução; Arnqvist & Nilsson (2000) incluem na monandria as fêmeas que copulam múltiplas vezes com o mesmo macho (“Repeated matings”);

II. **Poliandria** – as fêmeas copulam múltiplas vezes, recebendo esperma de mais do que um macho, durante cada ciclo de reprodução.

Arnqvist et al. (2000) referem que, em termos de conflito entre sexos, a monandria e poliandria têm significados diferentes. No primeiro caso, não existe competição espermática, e, por isso, não ocorre conflito entre sexos, bem como selecção sexual depois do acasalamento. Pelo contrário, no caso da poliandria, ocorre competição espermática, existindo por isso condições para existir conflito entre sexos e, consequentemente, coevolução antagonista entre sexos.

A poliandria pode ser dividida em três subtipos, de acordo com a receptividade das fêmeas (Quadro 2):

A. Receptividade restringida – as cópulas acontecem normalmente no início da vida adulta, sendo seguidas de um período de não receptividade até a morte;

B. Receptividade cíclica – as cópulas sucedem-se separadas por períodos de não receptividade;

C. Receptividade contínua – as cópulas ocorrem de forma mais ou menos continuada.

Em muitas espécies de insectos, as fêmeas podem voltar a copular quase imediatamente após o primeiro acasalamento. Existem outras que mostram pouco interesse em copular nos dias a seguir, semanas ou inclusive para sempre. Os machos vão ter mais vantagens se as fêmeas com que copulam são inibidas sexualmente durante longos

períodos e se reproduzem enquanto o esperma estiver livre de competição com o de outros machos (Harmer et al., 2006).

**Quadro 2.** Exemplos de espécies ou grupos de insectos associados a cada sistema de acasalamento das fêmeas (adaptado de Thornhill e Alcock 2001).

Sistemas de acasalamento	Ordem	Familia	Género / Espécie
I. Monandria	Hymenoptera	Anthophoridae	<i>Centris pallida</i>
	Diptera	Muscidae	<i>Musca domestica</i>
	Coleoptera	Scolytidae	<i>Hylurgus ligniperda</i>
A. Acasalamentos simples			
B. Acasalamentos repetidos			
II. Poliandria			
A. Receptividade restringida	Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>
	Hymenoptera	Formicidae	<i>Pogonomyrmex rugosus</i>
B. Receptividade cíclica	Diptera	Drosophilidae	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Odonata	Calopterygidae	<i>Calopteryx maculata</i>
C. Receptividade contínua	Hymenoptera	Megachilidae	<i>Anthidium maculosum</i>
	Hemiptera	Pentatomidae	<i>Nezara viridula</i>

## 2.2. Mecanismos que controlam a receptividade da fêmea

As fêmeas têm mecanismos internos que controlam a receptividade (Quadro 3) e algumas funcionam com um calendário programado de declínio da mesma. Por exemplo, as fêmeas de *Pimpla instigator* (F.) (Hymenoptera; Ichneumonidae) copulam durante os primeiros cinco a sete dias após a emergência, e deixam a partir daí de estar receptivas, independentemente de terem copulado ou não (Thornhill & Alcock, 2001).

Em algumas espécies, a receptividade não depende de um relógio biológico mas da estimulação sensorial recebida durante a corte ou a cópula e, noutros casos, da aquisição de fluidos seminais. Algumas substâncias podem fazer com que diminua a receptividade, reduzindo a taxa de acasalamento, ou, em alguns casos, actuando como repelentes para outros machos. A aquisição de recursos alimentares também desempenha um papel importante, uma vez que as fêmeas que terminam a cópula prematuramente, devido a falta de “oferendas nupciais”, provavelmente não receberam a dose completa de factor anti-



---

receptividade (“anti-receptivity factor”) e vão procurar outro macho para copular (Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mousseau, 2002; Thornhill & Alcock, 2001).

Em alguns Odonata, o início da receptividade parece ser desencadeado pelo desenvolvimento interno de óvulos maduros, preparados para a postura. Durante a postura, as fêmeas vão aceitar outros machos, mas uma vez postos todos os ovos deixam de estar receptivas (Thornhill & Alcock, 2001).

A presença de esperma na fêmea, a reposição e armazenamento do esperma são factores muito importantes (Arnqvist & Nilsson, 2000; Thornhill & Alcock, 2001). Em algumas espécies, o armazenamento e reposição de esperma podem induzir a inibição da receptividade sexual. Estudos realizados em *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) demonstraram que a quantidade de esperma transferido durante a cópula e o seu armazenamento desempenham um importante papel na receptividade, já que se a fêmea receber pouco ou nenhum esperma terá maior probabilidade de voltar a copular (Harmer et al., 2006; Mossinson & Yuval, 2003; Radhakrishnan et al., 2009).

A cópula (mais especificamente, factores transferidos pelo macho durante a cópula) pode modular a receptividade da fêmea e estimular a postura dos ovos em muitas espécies de dípteros, incluindo *Musca domestica* (L.), *Glossina moristans* (Westwood) (Glossinidae), *Drosophila melanogaster* (Meig) e *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Calliphoridae). Aparentemente, as glândulas acessórias contêm factores que contribuem para a redução da receptividade da fêmea (Jang, 1995). Em muitas moscas, os factores transferidos pelo macho durante a cópula têm um papel fundamental no encurtamento da receptividade (Mossinson & Yuval, 2003).

**Quadro 3.** Mecanismos que controlam a receptividade da fêmea (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mousseau, 2002; Thornhill & Alcock, 2001).

Factores
A. Relógio biológico
B. Estimulação através da corte
C. Estimulação através da cópula
D. Esgotamento de óvulos maduros
E. Presença de esperma na fêmea
F. Aquisição de fluidos seminais
- Inibidores da receptividade
- Recursos alimentares

---

## 2.3. Custos e benefícios da poliandria

### 2.3.1. Longevidade

Os mecanismos de estimulação através da cópula (Quadro 4) têm custos ecológicos para a fêmea, como tempo e energia, mas também aumenta o risco de predação, lesões físicas e infecção por parasitas/patogénicos, embora algumas substâncias químicas transferidas sexualmente protejam a fêmea da predação. Todos estes custos fazem com que a longevidade da fêmea seja reduzida (Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mousseau, 2002; Kaspí & Parella, 2008; Rolff & Siva-Jothy, 2002; Thornhill & Alcock, 2001). Rolff & Siva-Jothy (2002), num estudo realizado em *Tenebrio molitor* (L.), (Coleoptera; Tenebrionidae), verificaram um decréscimo na longevidade das fêmeas desta espécie, ao copular múltiplas vezes. Esta redução pode ser devida ao enfraquecimento do sistema imunitário, tendo uma outra consequência, a maior vulnerabilidade a transmissão de doenças através da cópula.

A aquisição de fluidos seminais, como os estimulantes de produção de ovos, pode diminuir a esperança de vida das fêmeas e os inibidores da receptividade podem afectar a esperança de vida de uma maneira positiva ou negativa (Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mosseau, 2002). Outros fluidos seminais, como as substâncias antiespérmicas, têm custos e benefícios na esperança de vida das fêmeas, dependendo da espécie, e os recursos alimentares fornecidos durante a corte e/ou cópula têm benefícios para a fêmea (Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mosseau, 2002).

A taxa de acasalamento pode influenciar a longevidade da fêmea. Fedorka & Mosseau (2002) compararam a longevidade de *Allonemobius socius* (Scudder) (Orthoptera; Gryllidae) em situação de monandria e poliandria, tendo as fêmeas que tinham copulado mais do que uma vez sofrido um decréscimo de 29 % na longevidade, em comparação com as monândricas.

Shuker et al. (2006) estudaram uma espécie muito promíscua, *Lygaeus equestris* (L.) (Hemiptera, Lygaeidae), com o objectivo de quantificar os custos da cópula para as fêmeas, em função do número de machos com que copulam. Verificaram que o aumento do número de cópulas originava um decréscimo na longevidade e fecundidade. Contudo, devido às diferentes condições em que se encontram as populações, consideraram que o grau de promiscuidade não é um bom factor para avaliar os custos da cópula.

Arnqvist & Andrés (2006) estudaram o comportamento da espécie monândrica *Musca domestica*. Para o efeito, induziram a cópula com mais do que um macho. Em termos de longevidade, descobriram que esta espécie tem vantagens em copular com mais do que um macho devido ao aumento das substâncias seminais acessórias.

**Quadro 4.** Mecanismos que influenciam a longevidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000; Fedorka & Mosseau, 2002, Thornhill & Alcock, 2001).

Factores	Benefícios	Custos
A. Taxa de cópula		X
B. Estimulação através da cópula		X
C. Aquisição de fluidos seminais		
- Inibidores da receptividade	X	X
- Recursos alimentares	X	
- Substâncias antiespérmicas	X	X
- Estimulantes da produção de ovos		X

### 2.3.2. Fecundidade

A taxa de acasalamento é um factor que pode influenciar positiva ou negativamente a fecundidade (Quadro 5). Os insectos têm benefícios em copular repetidamente, em comparação com os que só copulam uma vez, mas um número excessivo de cópulas também pode ter efeitos negativos porque pode influenciar negativamente a fecundidade, principalmente ao reduzir a esperança de vida. Para cada espécie, deve haver um número óptimo de cópulas para as fêmeas. O mesmo acontece com a presença de esperma que estimula a produção de ovos, mas que em excesso pode ter o efeito contrário (Arnqvist & Nilsson, 2000; Rolff & Siva-Jothy, 2002).

A reposição e armazenamento de esperma também vão ter um papel importante na fecundidade (Arnqvist & Nilsson, 2000). Estudos realizados na mineira *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) concluíram que as fêmeas que copularam duas vezes ou acasalaram livremente tiveram maior descendência do que as fêmeas que só copularam uma vez. A maioria das fêmeas volta a copular antes que o esperma armazenado tenha sido todo utilizado, sugerindo que, para além da quantidade, a reposição de esperma é um factor importante para o sucesso reprodutivo da fêmea (Kaspi & Parella, 2008). O armazenamento de esperma tem que ser a um nível em que a fêmea não perca a receptividade para poder voltar a copular (Kaspi & Parella, 2008).

O mecanismo de estimulação, através da cópula, tem custos ecológicos (já foram citados no ponto 3.1), que fazem diminuir a taxa de produção de ovos, mas a cópula tem efeito positivo porque estimula a fecundidade (Arnqvist & Nilsson, 2000).

A aquisição de fluidos seminais, tais como os recursos alimentares, inibidores da receptividade da fêmea e os estimulantes de produção de ovos, pode influenciar a fecundidade de maneiras diferentes. Os recursos alimentares aumentam a fecundidade da fêmea, ao contrário dos inibidores da receptividade da fêmea (Arnqvist & Nilsson, 2000).

Os estimulantes de produção de ovos, mais especificamente algumas substâncias gonadotrópicas, podem provocar ou estimular a produção de ovos e também estimular a maturação e postura dos mesmos (Arnqvist & Nilsson, 2000).

Shuker et al. (2006) descobriram que na espécie *Lygaeus equestris* a longevidade e a fecundidade estão relacionadas com a duração da cópula e que esta última não está relacionada com a quantidade de esperma transferida.

Arnqvist & Andrés (2006), também, verificaram que a quantidade de esperma não tem efeitos detectáveis no desempenho reprodutivo das fêmeas de *M. domestica*. Mas as substâncias seminais influenciaram a fecundidade diária e a longevidade das fêmeas desta espécie, que foi menor quando houve menor transferência dessas substâncias, devido ao seu efeito nutritivo. Concluíram que a capacidade reprodutiva da fêmea de *M. domestica* pode ser incrementada com a poliandria, não do ponto de vista da variabilidade genética, ou da reposição e armazenamento de esperma, mas pelos efeitos directos das substâncias seminais, embora outro tipo de substâncias seminais sejam responsáveis pela indução da monandria.

**Quadro 5.** Mecanismos que influenciam a fecundidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000 Kaspi & Parella, 2008, Rolff & Siva-Jothy, 2002).

Factores	Benefícios	Custos
A. Taxa de cópula	X	X
B. Estimulação através da cópula	X	X
C. Presença de esperma na fêmea		X
D. Aquisição de fluidos seminais		
- Inibidores da receptividade		X
- Recursos alimentares	X	
- Estimulantes da produção de ovos	X	

---

### 2.3.3. Fertilidade

A presença de esperma na fêmea aumenta a fertilidade, mas um excesso pode ter o efeito contrário, segundo Arnqvist & Nilsson (2000).

Algumas substâncias seminais, também, podem influenciar a fertilidade, como os inibidores da receptividade, que a podem reduzir. As substâncias proespérmicas têm efeito contrário, podendo provocar o consumo ou armazenamento de esperma, actuando no interesse do macho que copulou com a fêmea, podendo incrementar a fertilidade (Arnqvist & Nilsson, 2000) (Quadro 6).

**Quadro 6.** Mecanismos que influenciam a fertilidade (adaptado de Arnqvist & Nilsson, 2000).

Factores	Benefícios	Custos
A. Presença de esperma na fêmea	X	X
B. Aquisição de fluidos seminais		
- Inibidores da receptividade		X
- Recursos alimentares	X	

### 2.3.4. Genética

Recentemente, a existência de benefícios genéticos associados à poliandria tem sido considerada como hipótese. Contudo, os resultados não têm sido conclusivos e alguns autores como Arnqvist & Nilsson (2002) preferem não os incluir como vantagens da poliandria.

As vantagens genéticas envolvem várias hipóteses (Fedorka, & Mousseau, 2002; Kaspi & Parella, 2008; Newcomer et al., 1999; Pizzari & Birkhead, 2002; Tregenza & Wedell, 2001; Yasui, 1998; Zeh & Zeh, 2001). A hipótese da diversidade da descendência (“offspring diversity hypothesis”), em caso de risco de existir competição de esperma, em que a fêmea tem a possibilidade de seleccionar “bons genes” dos diferentes machos com que copulou, aumentando a probabilidade de produzir descendência de maior qualidade; a hipótese da selecção sexual do esperma (“sexually selected sperm hypothesis”), segundo a qual os filhos de fêmeas poliândricas produzem esperma mais competitivo; a hipótese da fuga à endogamia (“inbreeding avoidance hypothesis”), que considera que a poliandria diminui o custo de endogamia, nas situações em que as fêmeas não podem evitar copular com parentes próximos; a hipótese da fuga à incompatibilidade genética (“genetic incompatibility avoidance hypothesis”), segundo a qual a cópula com diversos machos permite às fêmeas

---

explorar mecanismos pós-copulatórios para minimizar o risco e/ou o custo de fertilização por esperma geneticamente incompatível; e a hipótese da valorização (“trading-up hypothesis”), em que as fêmeas de espécies sociais monogâmicas efectuam várias cópulas para compensar a má qualidade do esperma dos primeiros machos.

#### **2.4. Poliandria em cochonilhas**

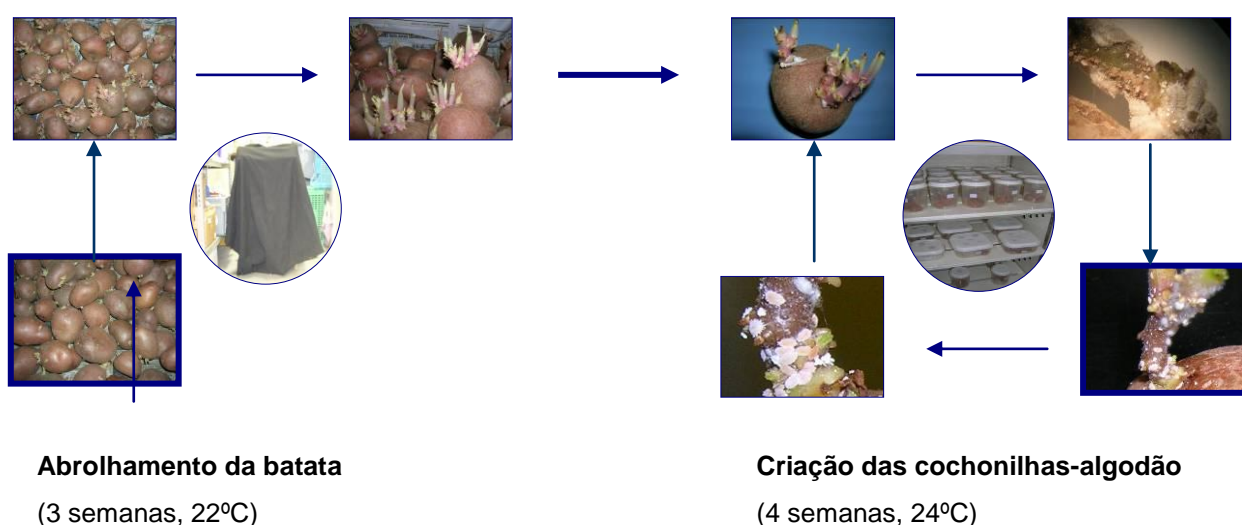
É um tema muito pouco estudado, havendo, por isso, muito pouca informação disponível. O único estudo encontrado na bibliografia foi realizado por Tashiro & Moffitt (1967), em relação à cochonilha pinta-vermelha, *Aonidiella aurantii* (Maskell) (Hemiptera: Diaspididae). Segundo estes autores, as fêmeas desta cochonilha podem copular com um máximo de oito machos, embora nem todas as cópulas tenham sucesso, e os machos podem copular com um máximo de 12 fêmeas. Contudo, a realização de múltiplas cópulas não se traduziu num aumento do potencial reprodutivo das fêmeas. Foi verificado um decréscimo da receptividade após a cópula, com um limite de 24 horas.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Criação das cochonilhas

Para obter o material biológico necessário aos ensaios a realizar, foi necessário proceder à criação em laboratório das duas espécies de cochonilhas-algodão estudadas, *Planococcus citri* (Risso) e *Pseudococcus calceolariae* (Maskell). Este processo, realizado semanalmente para assegurar a manutenção das populações, decorreu em duas fases distintas (Fig. 1): a obtenção do substrato vegetal necessário à criação das cochonilhas, *i.e.* brotos de batata (*Solanum tuberosum* L.); e a criação propriamente dita. Estas duas fases decorreram em salas separadas, com o propósito de evitar contaminações.

Com o mesmo propósito, as várias espécies de cochonilhas-algodão foram mantidas isoladas em câmaras climatizadas. O manuseamento das mesmas foi realizado separadamente, após a desinfecção da bancada de trabalho e de todo o material utilizado.



**Fig. 1.** Esquema de criação de cochonilhas-algodão em laboratório, ilustrando as duas fases de criação (Silva, 2008).

A) Fase de crescimento dos brotos de batata: Os tubérculos de batata da variedade Desirée, com peso médio de 91 g, foram lavados para remover qualquer sujidade e posteriormente colocados em tabuleiros apropriados (440 x 340 x 120 mm), tendo sido mantidos num compartimento ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ \%} \pm \text{h.r.}$ , fotoperíodo 00L:24E), durante cerca de 20 dias, até à formação de brotos com comprimento médio de 50 mm. Os tabuleiros foram cobertos com um tecido de cor negra para que o desenvolvimento dos brotos ocorresse sem formação de solanina, substância que pode interferir com o

---

desenvolvimento das cochonilhas-algodão. Os tubérculos foram pulverizados com água regularmente.

B) Criação de cochonilhas-algodão em laboratório: A fase de criação propriamente dita consistiu em colocar dois ovissacos com ovos da cochonilha-algodão por cada brolho. Cada lote de oito tubérculos foi colocado em caixas de plástico (170 x 170 x 90 mm), fechadas com tampas herméticas, com cinco orifícios (30 mm de diâmetro), revestidas com “étamine”, para permitir o arejamento, e mantidas numa câmara climatizada ( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\% \pm 0,5\% \text{ h.r.}$ ) às escuras.

A criação de ambas as espécies tem sido mantida em laboratório, desde 2004, com renovação, em média, anual das populações, através da introdução de posturas provenientes de exemplares colhidos em pomares de citrinos. O material biológico utilizado nos ensaios foi obtido a partir de populações colhidas em laranjeira-doce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, na região de Silves, no caso de *P. citri*, em Loulé, no caso de *P. calceolariae*, tendo completado 20-33 gerações e 29-32 gerações, respectivamente.

Realizaram-se preparações microscópicas de sub-amostras de fêmeas utilizadas no ensaio e confirmadas as espécies.

### **3.2. Isolamento**

A partir das populações mantidas em insectário, foram isolados machos e fêmeas de *P. citri* e *P. calceolariae*, em caixas de plástico devidamente arejadas (Figura 2). Para garantir a obtenção de indivíduos virgens, os machos foram isolados no estado de pré-pupa e as fêmeas no 3º instar ninfal. Os indivíduos isolados foram mantidos numa câmara climatizada (nas mesmas condições referidas em 3.1.B) até a realização dos ensaios, tendo igualmente sido assegurado, durante este período, o fornecimento de alimento (i.e., brolhos de batatas) às fêmeas isoladas.

Os machos foram mantidos às escuras até ao início dos ensaios, para garantir a sua predisposição para procurar fêmeas e acasalar.





**Fig. 2.** Caixas de isolamento de *Planococcus citri* (Risso) (original da autora).

### **3.3. Poliandria e período de receptividade das fêmeas após a cópula**

#### **3.3.1. Até 3,5 horas após a cópula**

Este estudo foi realizado previamente, entre o início de Maio e final de Julho de 2007 (EB Silva, dados não publicados), para avaliar a existência de poliandria nas fêmeas de *P. citri*. Para o efeito, procurou-se determinar se, após a fecundação, as fêmeas deixam de ser receptivas e se cessam, ou não, e no caso de manterem a receptividade durante quanto tempo a mantêm. Para o efeito, expuseram-se machos virgens e sexualmente maduros a fêmeas virgens, com 5 dias de idade (1 casal por placa de Petri), durante um máximo de uma hora, até se verificar a cópula. Após a cópula, cada fêmea foi exposta a outro macho, 0,5 h, 1,5 h, 2,5 h, ou 3,5 h depois, durante um máximo de 1 h, tendo-se registado a existência ou não de acasalamento. Considerou-se como fêmeas fecundadas as que realizaram postura, não tendo sido contabilizado o número de ovos postos. Foram efectuadas 50 repetições por modalidade. Determinou-se, também, o tempo mínimo para a ocorrência de tentativa de cópula e cópula e a duração da cópula.

Os ensaios foram realizados em condições de laboratório ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ \%} \pm 0,5\text{ \% r.h.}$ , 295 lux).

### 3.3.2. Até 24 horas após a cópula

Neste estudo, que decorreu entre Novembro de 2009 e Maio de 2010, pretendeu-se dar continuidade aos ensaios referidos em 3.3.1, prolongado o período de estudo até 24 h após a cópula.

Foram realizados ensaios preliminares para definir o protocolo experimental a seguir, nomeadamente a respectiva duração, o número de machos por repetição e a técnica a utilizar. Nesse sentido, fêmeas de *P. citri* foram expostas a grupos de machos, em placa Petri (90 mm de diâmetro e 15 mm de altura), até ocorrer a cópula (Figura 3). De seguida,



retiraram-se os restantes machos e esperou-se até a cópula ter sido finalizada. Dado a diferença entre as dimensões do macho e da fêmea, foi necessário confirmar a cópula com o auxílio de um espelho colocado por debaixo da placa de Petri, na lupa binocular.

**Fig. 3.** Cópula de *Planococcus citri*

(Risso) (12x) (Original de Elsa Borges da Silva)

Deste modo, definiu-se um tempo máximo de 1,5 h para início da cópula (duração máxima de cada ensaio) e a utilização de três machos por repetição para facilitar a cópula, dado que, de acordo com Silva (em preparação), os machos desta espécie são muito selectivos na aceitação da fêmea. A tampa da placa de Petri foi substituída por parafilme, para evitar que os machos pudessem fugir.

Em cada repetição, uma vez terminada a cópula, foi colocado um brolho de batata para servir de alimento à fêmea, até ao início da segunda cópula. As segundas cópulas foram realizadas ao fim de 8 h, 16 h e 24 h após a primeira cópula, tendo sido utilizado o mesmo procedimento atrás referido.

No final de cada ensaio, as fêmeas foram mantidas com alimento, numa câmara climatizada, até o início da postura. Finalmente, procedeu-se à contagem do número total de ovos postos por fêmea (Figura 4), tendo-se mantido cada uma delas até à morte.



**Fig. 4.** Postura de *Planococcus citri* (Risso)

(Original de Elsa Borges da Silva)

---

Registou-se a ocorrência de cópula e determinou-se o tempo até à corte, duração da corte, início e duração da cópula. Foi, igualmente, contabilizado o número total de ovos postos por fêmea, no caso dos ensaios em que ocorreu cópula.

Foram efectuadas 50 repetições para a primeira cópula e modalidade testada. Em relação apenas à segunda cópula, o número de repetições foi variável, de acordo a resposta dos machos.

Os ensaios foram realizados em condições de laboratório ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ \%} \pm 0,5\text{ \% r.h.}$ , 295 lux).

### 3.4. Efeito da cópula na atractividade de fêmeas relativamente aos machos

Tendo em vista determinar se a emissão de feromona sexual pelas fêmeas é afectada pela cópula, procedeu-se à realização de um ensaio em olfactómetro de ar estático



(Vet, 1983; van Alphen & Jervis, 1996), constituído por três arenas cilíndricas (50 mm de diâmetro e 16 mm de altura) que comunicam entre si, através de um corredor (20 mm de largo e 5 mm de altura), estando o dispositivo coberto por uma lâmina de vidro (Fig. 5).

**Fig. 5.** Olfactómetro de ar estático (original da autora)

Para o efeito, foram utilizados machos virgens e fêmeas fecundadas de *P. citri*, com tempos crescentes desde a primeira cópula. Cada macho foi introduzido na arena central, tendo-se registado a sua resposta em relação a dois estímulos alternativos. Estudaram-se as seguintes combinações de estímulos: fêmea virgem (5 dias) *versus* fêmea fecundada, 0,5 h, após a cópula; fêmea virgem *versus* fêmea fecundada, 3,5 h após a cópula; e fêmea virgem *versus* fêmea fecundada, 24 h após a cópula. A duração máxima do ensaio foi de 30 minutos.

Cada modalidade foi repetida 50 vezes. Os ensaios foram realizados em condições de laboratório ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ \%} \pm 0,5\text{ \% r.h.}$ , 295 lux) e tiveram duração máxima de 30 minutos.

A afectação de cada uma das modalidades, pelas duas arenas do olfactómetro, foi efectuada de forma alternada em cada repetição. Entre repetições, o olfactómetro foi

---

colocado em água e detergente, durante 10 minutos, sendo posteriormente lavado com água corrente e, por último, com hexano.

### 3.5. Efeito dos acasalamentos múltiplos na fecundidade

Este estudo foi realizado com a colaboração de uma aluna finalista de Biologia, no âmbito do seu projecto final de curso (Prieto, 2010). Tendo por base a hipótese de poliandria, pretendeu-se avaliar eventuais benefícios, nomeadamente em termos de fecundidade. Para o efeito, seleccionou-se a espécie *P. calceolariae* pelo facto dos respectivos machos serem bastante menos selectivos em relação às fêmeas dos que os machos de *P. citri* (Elsa Borges da Silva et al., dados não publicados), o que permite a realização de um número maior de cópulas, no mesmo período de tempo.

Foram utilizados machos e fêmeas virgens de *P. calceolariae*, previamente isolados a partir das populações mantidas em insectário, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Os ensaios foram realizados semanalmente, entre Fevereiro e Maio de 2010, tendo todas as cópulas sucessivas, correspondentes a uma única fêmea, sido efectuadas durante a mesma manhã. Cada fêmea foi submetida a uma de cinco modalidades, correspondentes a um número crescente de cópulas com machos virgens (uma a cinco), com 40 repetições



**Fig. 6.** Postura de *Pseudococcus calceolariae* (Maskell) (Original de Elsa Maria Borges da Silva)

por modalidade. Após a última cópula, as fêmeas fecundadas foram mantidas em câmara climatizada (nas mesmas condições referidas em 3.1.B), com alimento, até que se iniciasse a postura (Figura 6). Posteriormente, procedeu-se à contagem de todos os ovos postos por cada fêmea, até à sua morte.

Os ensaios foram realizados em condições de laboratório ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $60\text{ \%} \pm 0,5\text{ \% r.h.}$ , 295 lux).

### 3.6. Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância considerado foi  $\alpha = 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS 17.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, USA).

---

Os dados da percentagem de acasalamentos, entre a primeira e a segunda cópula, tendo em consideração o tempo decorrido entre as duas cópulas (até 3,5 h), foram analisados através do modelo *Loglinear General*, utilizando a distribuição de Poisson, tendo sido realizadas diferentes comparações entre a primeira cópula e os subsequentes intervalos testados das segundas cópulas (i.e., 0,5 h, 1,5 h, 2,5 h e 3,5 h). Os dados obtidos com a nova metodologia foram analisados de forma semelhante, tendo-se procedido à comparação entre os diferentes tempos decorridos após a primeira cópula (i.e., 8 h, 16 h e 24 h).

O número de ovos postos por fêmea, em função do tempo decorrido entre cópulas (i.e., 8 h, 16 h e 24 h), foi submetido a análise de variância (ANOVA) para o conjunto dos dados (i.e., cada modalidade foi analisada como um todo, sem fazer distinção entre a primeira e segunda cópula), para averiguar o efeito da ordem de cópula, da modalidade e da interação entre estes dois factores. Posteriormente, procedeu-se à análise separada do número de ovos postos por fêmea em relação às modalidades testadas, para cada uma das cópulas. Seguidamente, foi usado o teste de Tukey HSD para comparação de médias. Como a igualdade de variâncias não foi garantida, foi necessário proceder à transformação logarítmica dos dados.

Os parâmetros tempo até a corte, duração da corte e duração da cópula, em função do tempo decorrido entre cópulas (0,5 h, 1,5 h, 2,5 h e 3,5 h), foram submetidos a ANOVA, para o conjunto de dados da segunda cópula. Procedimento idêntico foi adoptado para a análise dos dados obtidos para os intervalos de tempo 8 h, 16 h e 24 h, mas, neste caso, conjunto de dados da primeira e segunda cópula. O número de repetições da primeira cópula na modalidade de 8 h foi de 15, em vez de 16, por omissão de um registo; de igual modo, o número de repetições da segunda cópula para a modalidade de 16 h foi 5, em vez de 6.

A estimativa do período, após a cópula, a partir do qual a fêmea deixa de ser receptiva foi realizada através de regressão linear, agregando os dados disponíveis sobre a percentagem de acasalamentos até 24 h após a primeira cópula.

Para o estudo da influência dos acasalamentos múltiplos na fecundidade das cochinilhas algodão, o número de ovos postos por fêmea em função do número de cópulas foi submetido, igualmente, a ANOVA.

---

No caso dos ensaios de dupla escolha, realizados em olfactómetro de ar estático, para avaliação da resposta dos machos em relação a fêmeas virgens e fêmeas fecundadas há 0,5 h, 3,5 h e 24 h, efectuou-se um teste de  $\chi^2$  para determinar se a frequência de respostas observada era significativamente diferente da esperada se as escolhas se fizessem aleatoriamente ( $p = q = 0,5$ ;  $N = 50$ ).

## 4. Resultados

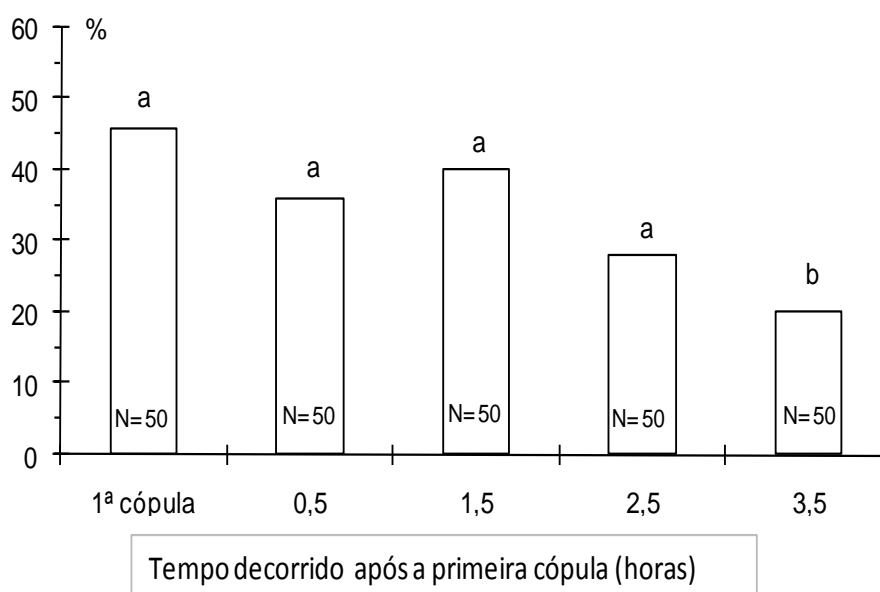
### 4.1. Poliandria

Os resultados mostraram que, tanto para *P. citri*, como para *P. calceolariae*, cada fêmea pode acasalar com mais do que um macho. No caso de *P. calceolariae*, verificou-se poderem ocorrer pelo menos cinco acasalamentos por fêmea.

### 4.2. Período de receptividade das fêmeas após a cópula

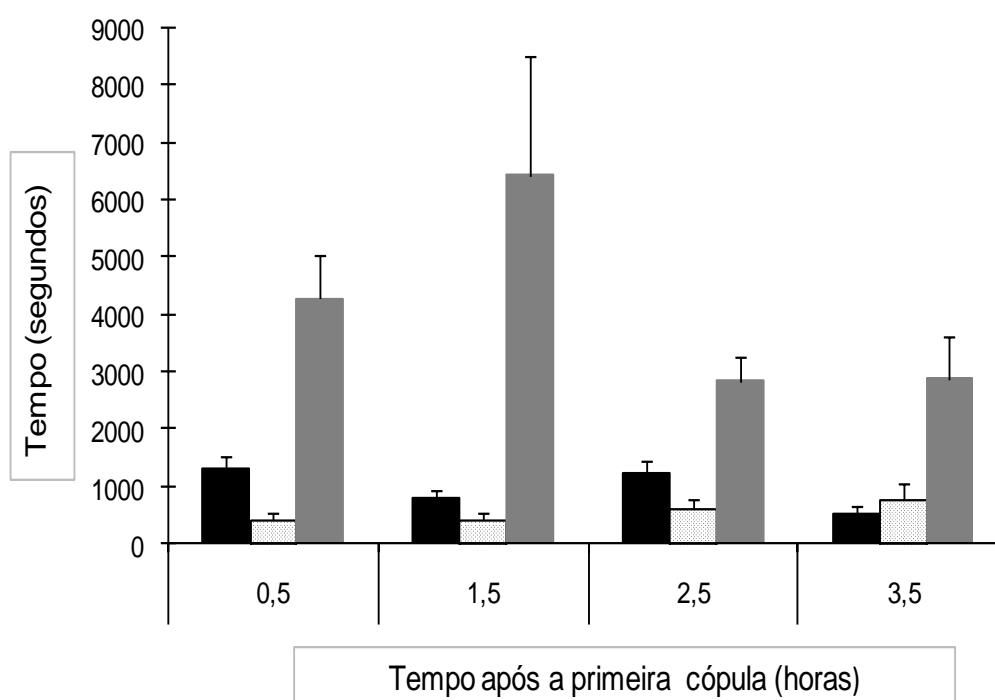
#### 4.2.1. Até 3,5 horas após a cópula

A percentagem de segundos acasalamentos até 2,5 h após o primeiro acasalamento não diferiu significativamente da registada na primeira cópula ( $\chi^2 = 0,302$ ,  $df = 3$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 7). Contudo, a percentagem de fêmeas que acasala uma segunda vez 3,5 h após a primeira cópula é significativamente menor ( $\chi^2 = 0,030$ ,  $df = 1$ ,  $P \leq 0,05$ ).



**Fig. 7** – Percentagem de acasalamentos com produção de ovos em função do tempo decorrido após a primeira cópula, em fêmeas de *Planococcus citri* (Risso) expostas a machos, em placa de Petri, durante 1 h; as colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ).

Não se observaram diferenças significativas entre modalidades, no que respeita ao tempo até ao início da corte ( $F_{3, 63} = 2,608$ ,  $P = 0,060$ ), duração da corte ( $F_{3, 63} = 1,177$ ,  $P = 0,326$ ) e duração da cópula ( $F_{3, 63} = 1,499$ ,  $P = 0,224$ ) (Fig. 8).

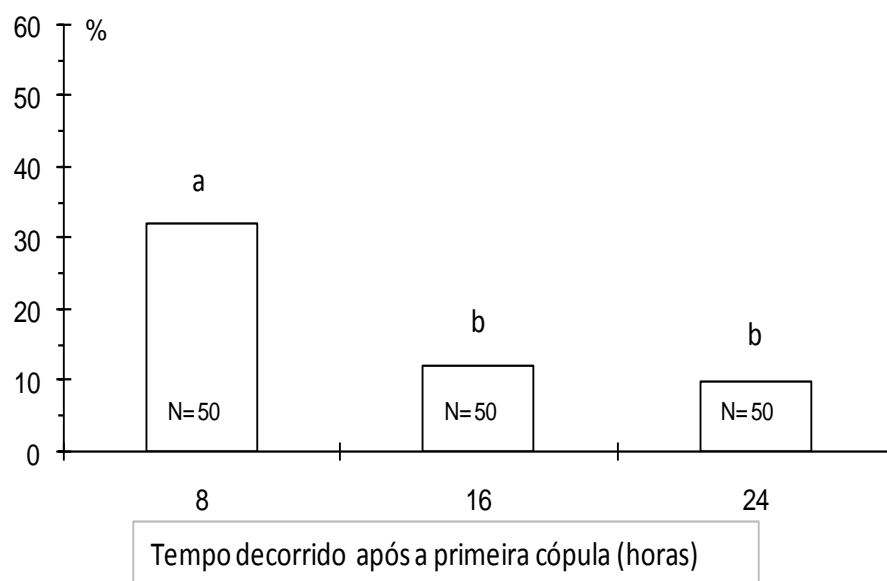


**Fig. 8** – Tempo até ao início da cópula (barra preta), duração da corte (barra branca) e duração da cópula (barra cinzenta) ( $\pm$  erro-padrão), no segundo acasalamento, em função do tempo decorrido entre a primeira e a segunda cópula (0,5 h, 1,5 h, 2,5 h e 3,5 h), na espécie *Planococcus citri* (Risso). Modalidade 0,5 h, N = 17; modalidade 1,5 h, N = 20; modalidade 2,5 h, N = 17; e modalidade 3,5 h, N = 9.

#### 4.2.2. Até 24 horas após a cópula

A percentagem de fêmeas que acasalou um segunda vez ao fim de um período de 16 h e 24 h após a primeira cópula foi significativamente inferior à da modalidade 8 h ( $\chi^2 = 0,002$ ,  $df = 1$ ,  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 9).

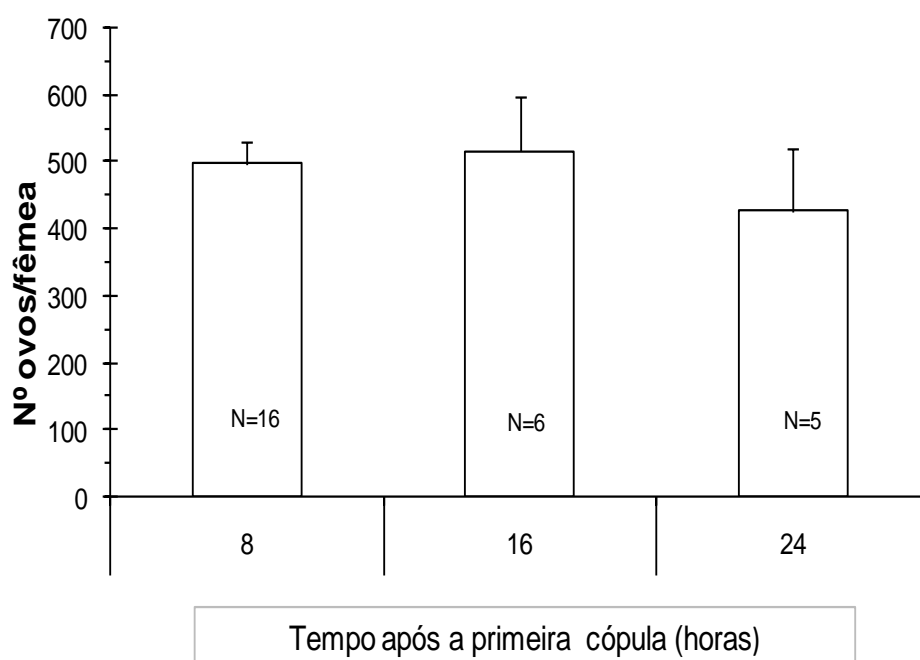




**Fig. 9** – Percentagem de acasalamentos com produção de ovos, em função do tempo decorrido após a primeira cópula, em fêmeas de *Planococcus citri* (Risso) expostas a machos, em placa de Petri, durante 1,5 h; as colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ).

O número de ovos postos por fêmea não variou significativamente entre a primeira e segunda cópula ( $F_{1,150} = 2,985$ ,  $P = 0,086$ ). Quando a análise foi feita entre modalidades (8 h, 16 h e 24 h) foram encontradas diferenças significativas ( $F_{2,150} = 3,156$ ,  $P = 0,046$ ) (Fig. 10) Não existe interação entre factores ( $F_{2,150} = 0,632$ ,  $P = 0,533$ ).

Na análise conjunta, o número de ovos postos por cada uma das fêmeas que acasalaram uma segunda vez, 24 h após a primeira cópula, foi significativamente inferior ao das modalidades 8h e 16h. Contudo, na análise separada para cada cópula, verificou-se existirem diferenças significativas entre as modalidades 8h e 16h e a modalidade 24 h ( $F_{2,120} = 4,732$ ,  $P = 0,011$ ), em relação às fêmeas que acasalaram uma única vez, não se tendo registado diferenças entre modalidades, no caso das fêmeas que acasalaram duas vezes ( $F_{2,24} = 1,899$ ,  $P = 0,172$ ).

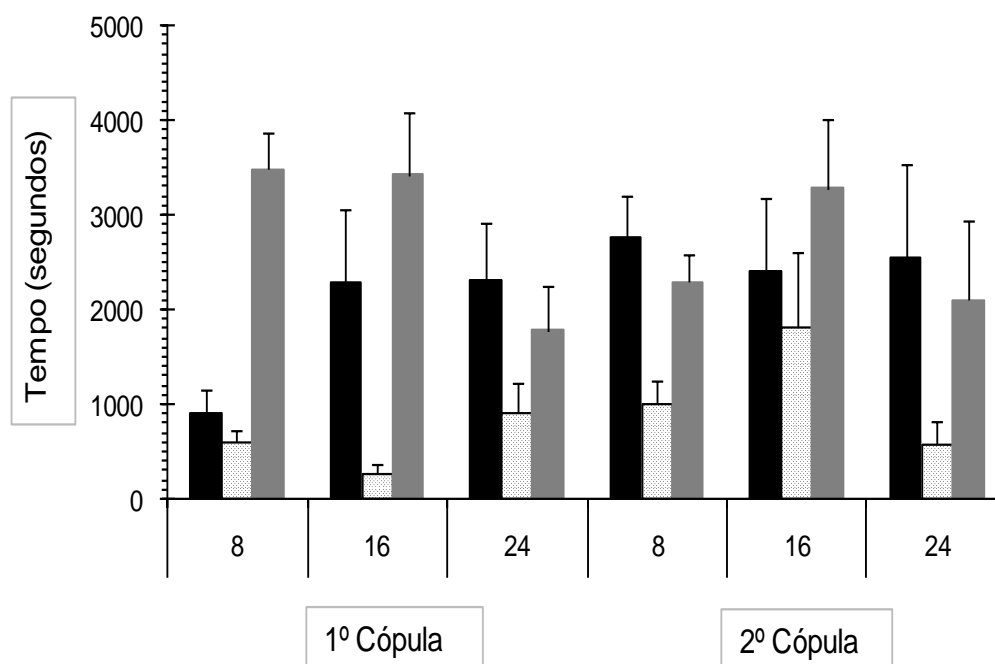


**Fig. 10** – Número médio ( $\pm$  erro-padrão) de ovos postos por fêmea de *Planococcus citri* (Risso) na segunda cópula, em do tempo decorrido entre estas.

Na análise conjunta, o tempo até ao início da corte, não variou significativamente entre a primeira e a segunda cópula ( $F_{1,52} = 2,293$ ,  $P = 0,137$ ), bem como entre modalidades (8 h, 16 h e 24 h) ( $F_{2,52} = 0,775$ ,  $P = 0,467$ ), não existindo, também interacção entre factores ( $F_{2,52} = 1,837$ ,  $P = 0,171$ ) (Fig. 11).

A duração da corte variou significativamente entre cópulas, sendo maior na segunda cópula ( $F_{1, 52} = 4,219$ ,  $P = 0,046$ ), mas não entre modalidades ( $F_{2, 52} = 0,455$ ,  $P = 0,637$ ). Verificou-se existir interacção entre factores ( $F_{2, 52} = 3,502$ ,  $P = 0,038$ ).

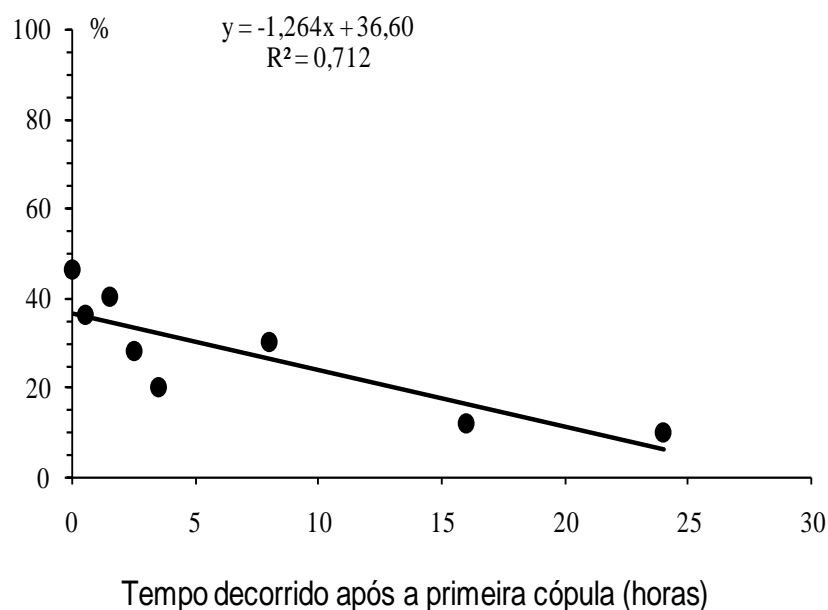
Em relação à duração da cópula, não se registaram diferenças significativas entre cópulas ( $F_{1, 52} = 0,585$ ,  $P = 0,448$ ) e modalidades ( $F_{2, 52} = 2,743$ ,  $P = 0,075$ ). Não existe, também, interacção entre factores ( $F_{2, 52} = 1,278$ ,  $P = 0,288$ ).



**Fig. 11** – Tempo até o início da corte (barra preta), duração da corte (barra branca) e duração da cópula (barra cinzenta) ( $\pm$  erro-padrão) em função da primeira e segunda cópula e do tempo decorrido entre os mesmos (8 h, 16 h, 24 h) na espécie *Planococcus citri* (Risso); primeira cópula: modalidade 8h, N = 15; modalidade 16 h, N = 6; modalidade 24 h, N = 5. Segunda cópula: modalidade 8 h, N = 16; modalidade 16 h, N = 5; modalidade 24 h, N = 5.

#### 4.2.3. Estimativa do período de receptividade

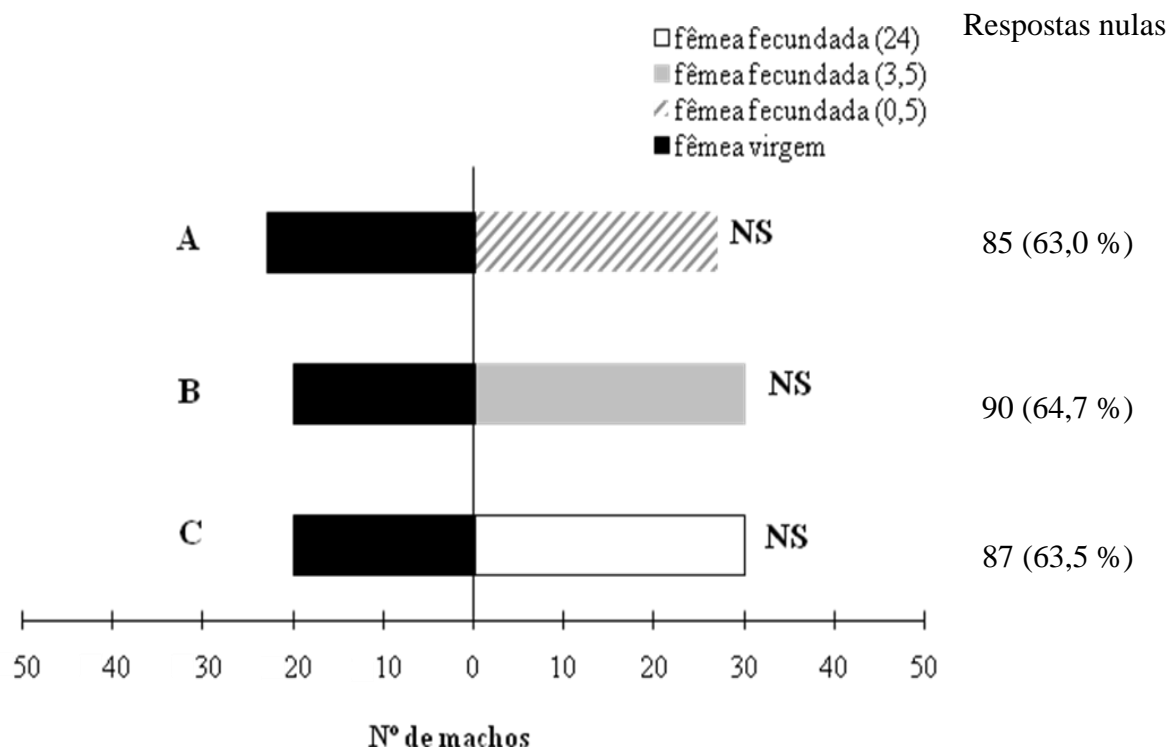
Por projecção da recta obtida por regressão linear, estima-se que o período, após a cópula, a partir do qual as fêmeas de *P. citri* deixam de ser receptivas seja de cerca de 29 h (Fig. 12).



**Fig. 12** –.Porcentagem de acasalamentos de *Planococcus citri* (Risso) em função do tempo decorrido após a primeira cópula; cada ponto na regressão corresponde ao valor médio obtido nos ensaios referidos em 3.2.1 e 3.2.2; o valor da percentagem de acasalamentos para  $t=0$  corresponde ao da primeira cópula ( $F_{1,6} = 14,833$ ,  $P = 0,008$ ).

#### 4.3. Efeito da cópula na atractividade de fêmeas relativamente aos machos

Nos ensaios de dupla escolha efectuados em olfactómetro de ar estático, não se verificaram diferenças significativas entre a atractividade de fêmeas virgens e a de fêmeas acasaladas há 0,5 h ( $\chi^2 = 2,000$ ,  $P = 0,157$ ), 3,5 h ( $\chi^2 = 2,000$ ,  $P = 0,157$ ) e 24 h ( $\chi^2 = 320$ ,  $P = 0,572$ ) (Fig. 13).

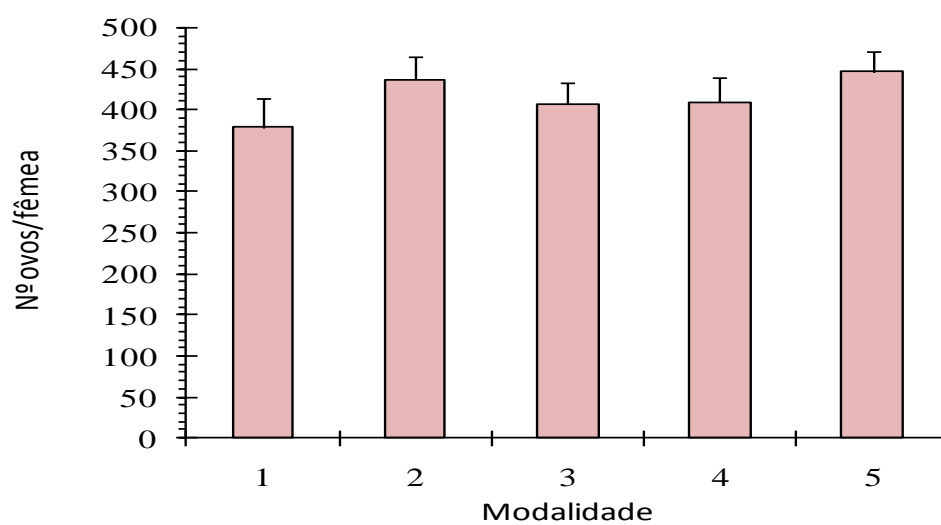


**Fig. 13** – Resultado dos ensaios de dupla escolha, em olfactómetro de ar estático, em que machos de *Planococcus citri* (Risso) escolheram em alternativa entre fêmeas virgens e fêmeas fecundadas há 0,5 h, 3,5 h, ou 24 h (N = 50); NS – distribuição de frequências não significativa.

#### 4.4. Efeito dos acasalamentos múltiplos na fecundidade

O tempo decorrido entre um acasalamento e o seguinte, para a mesma fêmea, variou entre, aproximadamente, 2 e 20 minutos. Considerando o número total de acasalamentos para cada fêmea, o tempo decorrido entre o primeiro e o último acasalamento variou entre, aproximadamente, 1e 3 horas.

O número médio de ovos postos por fêmea variou entre 379, no caso de um acasalamento por fêmea, e 446, no caso das fêmeas que acasalaram com cinco machos. Contudo, apesar do aparente acréscimo de fecundidade das fêmeas que acasalaram duas ou mais vezes, em relação às que foram fecundadas, apenas, uma vez, não se registaram diferenças significativas entre modalidades ( $F_{4,200} = 0,836$ ,  $P = 0,504$ ) (Fig. 14).



**Fig. 14** – Número médio ( $\pm$  erro-padrão) de ovos postos por fêmea de *Pseudococcus calceolariae* (Maskell), em função do número de cópulas realizadas por fêmea (1 a 5), em ensaios realizados com machos virgens maduros e fêmeas virgens com 5 dias de idade, durante o período da manhã (N = 40).

---

## 5. Discussão

Os resultados obtidos suportam a hipótese de poliandria nas duas espécies estudadas, *P. citri* e *P. calceolariae*, que a existir será do tipo “receptividade restrita” (Thornhill & Alcock, 2001), devido ao curto período de receptividade das fêmeas, após o acasalamento (no máximo, pouco mais do que um dia, em *P. citri*). A existência de poliandria em cochonilhas, apenas foi sugerida antes por Tashiro & Moffitt (1967), em relação à cochonilha pinta-vermelha, *A. aurantii*. Estes autores também estimaram um período de receptividade das fêmeas, após cópula, de cerca de 24 h.

Contudo, o facto das fêmeas das cochonilhas-algodão poderem copular com mais do que um macho, em condições de laboratório, não só, não garante que o esperma de todos os machos esteja envolvido na fertilização dos ovos, como também, não é suficiente para demonstrar a existência de poliandria, em condições de campo. Segundo alguns autores (e.g., Arnqvist et al., 2000), a poliandria pressupõe que haja transferência de genes de vários machos para a descendência. Por exemplo, em algumas espécies de insectos, o esperma utilizado pela fêmea, para fertilização dos ovos, provém, quase exclusivamente, do último macho a acasalar (Thornhill & Alcock, 2001), o que de acordo com este critério não corresponde a uma situação de poliandria.

Por outro lado, ao contrário do que acontece em laboratório, na natureza, os machos, geralmente, têm de voar para localizar as fêmeas e acasalar, necessitando por isso de gastar energia para o fazer, o que vai condicionar a sua longevidade e o seu potencial reprodutivo. Os machos só voam durante um curto período de tempo por dia, ao início da manhã, no caso de *P. citri* (Moreno et al., 1984; Silva et al., 2009), ou ao início da manhã e fim da tarde, no caso de *P. calceolariae* (Rotundo & Tremblay, 1976), não se sabendo se podem efectuar mais do que um voo durante o seu curto período de vida. A realização de mais do que um voo aumentaria a possibilidade de poliandria.

A probabilidade de uma fêmea acasalar com mais do que um macho dependerá, entre outros factores, da abundância de machos, função da densidade populacional e da proporção entre sexos, do seu grau de atractividade em relação a outras fêmeas, bem como da duração do período de receptividade após o primeiro acasalamento. Situações em que exista uma desproporção entre fêmeas e machos, a favor destes últimos, serão mais favoráveis à poliandria, uma vez que é de esperar menor disponibilidade relativa de fêmeas virgens. A atractividade de uma fêmea é função da sua capacidade de produzir e emitir feromona sexual, a qual poderá ser variável entre fêmeas, podendo ser, também,

---

influenciada pela idade. Silva et al. (dados não publicados) verificaram, em ensaios de dupla escolha em olfactómetro, que a atractividade das fêmeas diminuía com a idade, no caso de *P. citri*, mas não de *P. calceolariae*. A distribuição espacial das fêmeas, também, pode condicionar a possibilidade de ocorrer poliandria, nas cochoilhas-algodão. Em igualdade de condições, é de esperar que fêmeas isoladas tenham menor probabilidade de acasalar com vários machos, do que fêmeas em colónias, uma vez que a capacidade de atrair machos será maior neste último caso, devido à maior emissão de feromona sexual. O curto período de receptividade das fêmeas, após o acasalamento, é um factor limitante da existência de poliandria nestas cochoilhas. No entanto, durante este período, a atractividade das fêmeas não parece diminuir, uma vez que nos ensaios de olfactómetro não se registaram diferenças entre a atractividade de fêmeas virgens e a de fêmeas fecundadas há 0,5 h, 3,5 h e 24 h, o que sugere que a diminuição da taxa de acasalamento em função do tempo após a cópula, no caso de *P. citri*, não se deve à diminuição da emissão de feromona, mas a outros factores. O facto da duração da corte ter sido superior na segunda cópula, sugere o envolvimento de marcadores químicos, possivelmente deixados durante a cópula pelo macho com que a fêmea acasalou, pela primeira vez, que são detectados pelos segundos machos, através de contacto directo, durante a corte, e que poderão condicionar a aceitação da fêmea. Contudo, este tipo de marcadores não permite explicar a diminuição da taxa de acasalamento em função do tempo após a primeira cópula, já que a duração da corte não variou ao longo do mesmo período. Deverão, pois, existir outros mecanismos responsáveis por esta diminuição. A receptividade das fêmeas pode ser controlada por mecanismos internos, em alguns casos funcionando como relógio biológico, como parece ser no caso de *P. citri*, uma vez que a taxa de acasalamento diminui em função do tempo decorrido após a primeira cópula. Esta diminuição, também, pode ser devida a estimulação sensorial recebida durante a corte ou a cópula, mas também a aquisição de fluidos seminais, nomeadamente inibidores da receptividade ou recursos alimentares (esta última hipótese é pouco provável, no caso das cochoilhas, uma vez que os machos não se alimentam durante o estado adulto). Outro factor que pode influenciar o início da receptividade é o desenvolvimento de ovos maduros, como acontece nalguns Odonata. A presença, quantidade e armazenamento de esperma em algumas espécies (por exemplo, *Bactrocera bryoni* ou *Ceratitis capitata*) podem influenciar, também, a receptividade sexual (Arnqvist & Nilsson, 2000; Harmer et al., 2006; Mossinson & Yuval, 2003; Radhakrishnan et al., 2009; Thornhill & Alcock, 2001).

No caso de *P. calceolariae*, a receptividade parece não ser influenciada pelo número de cópulas que a fêmea realizou anteriormente, uma vez que a taxa de acasalamento foi de



---

100%, tanto nos ensaios efectuados com fêmeas virgens, como nos realizados com fêmeas fecundadas até cinco vezes.

A poliandria apresenta benefícios, mas também tem custos (ver revisão bibliográfica). Se as cochonilhas-algodão forem poliândricas é porque isso lhes confere vantagens adaptativas, em comparação com a monandria. Neste pressuposto, pretendeu-se determinar se a fecundidade aumentava em função do número de acasalamientos, uma vez que o incremento da fecundidade constitui uma das vantagens comuns da poliandria (e.g., Arnqvist & Andrés, 2006; Fedorka & Mousseau, 2002). Existem vários factores, associados à realização de vários acasalamientos, que podem influenciar, positiva ou negativamente, a poliandria, como a reposição e armazenamento de esperma, os mecanismos de estimulação através da cópula ou a aquisição de fluidos seminais (Arnqvist & Nilsson, 2000). Os resultados obtidos sugerem que a fecundidade das fêmeas de *P. calceolariae* e *P. citri* não é favorecida pelo número de acasalamientos, pelo que o aumento da fecundidade não parece constituir uma vantagem da poliandria nesta espécie. Resultados idênticos foram obtidos por Tashiro & Moffitt (1967), para a cochonilha pinta-vermelha.

Apesar de não ser possível inferir que a existência de poliandria nas cochonilhas-algodão constitui um meio para garantir maior número de descendentes, o recurso a este sistema de acasalamento poderá trazer outro tipo de vantagens para as fêmeas, como o incremento da variabilidade genética da sua descendência, entre outras (Fedorka, & Mousseau, 2002; Kaspi & Parella, 2008; Newcomer et al., 1999; Pizzari & Birkhead, 2002; Tregenza & Wedell, 2001; Yasui, 1998; Zeh & Zeh, 2001). A existência de outras vantagens, bem como os possíveis custos que a poliandria pode conferir às fêmeas das cochonilhas-algodão (e.g., decréscimo da longevidade), constituem aspectos a considerar em estudos futuros.

---

## 6. Conclusões

Demonstrou-se que, em condições de laboratório, as fêmeas de *P. citri* e *P. calceolariae* podem acasalar com mais do que um macho (pelo menos até cinco, no caso de *P. calceolariae*), suportando a hipótese de ocorrer poliandria em populações naturais.

Mostrou-se que, pelo menos, algumas fêmeas de *P. citri* se mantêm receptivas 24h após o acasalamento, tendo-se estimado que a receptividade se poderá manter até um máximo de cerca de 29 horas. No caso de *P. calceolariae*, a receptividade parece não ser influenciada pelo número de cópulas que a fêmea realizou anteriormente.

Os ensaios em olfactómetro mostraram que a atractividade das fêmeas não é afectada após a cópula, sugerindo que esta não inibe a emissão de feromona. Outros factores deverão ser responsáveis pela diminuição da taxa de acasalamento em função do tempo decorrido após a cópula.

O número de cópulas realizadas com diferentes machos não influenciou a fecundidade das fêmeas de *P. calceolariae*, pelo que o aumento da descendência não constitui uma vantagem adaptativa da poliandria.

## Referências bibliográficas

Arnqvist, G. & Andrés, J.A. 2006. The effects of experimentally induced polyandry on female reproduction in a monandrous mating system. *Ethology* 112, 748-756.

Arnqvist, G., Edvardsson, M., Friberg, U. & Nilsson, T. 2000. Sexual conflict promotes speciation in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97 (19), 10460-10464.

Arnqvist, G. & Nilsson, T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*. 60, 145-164.

Fedorka, K.M. & Mousseau, T.A. 2002. Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. *Animal Behaviour* 64, 361-367.

Franco, J.C., Silva, E.B. & Carvalho, J.P. 2000. Cochonilhas-algodão (Hemiptera, Pseudococcidae) associadas aos citrinos em Portugal. ISA Press, Lisboa, 142 pp.

Franco, J.C., Zada, A. & Mendel, Z. 2009. Novel approaches for the management of mealybug pests. In: Ishaaya I, Horowitz, A.R. (eds.) *Biorational Control of Arthropod Pest*. Springer, Dordrecht. Pp. 233-278.

Harmer, A.M.T., Radhakrishnan, P. & Taylor, P.W. 2006. Remating inhibition in female Queensland fruit flies: Effects and correlates of sperm storage. *Journal of Insect Physiology*. 52, 179-186.

Jang, E.B. 1995. Effects of mating and accessory-gland injections on olfactory-mediated behavior in the female mediterranean fruit-fly, *Ceratitidis capitata*. *Journal of Insect Physiology*. 41, 705-710.

Kaspi, R. & Parella, P. 2008. Polyandry and Reproduction in the Serpentine Leaf Miner *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Journal of Insect Behaviour*. 21: 323-336.

Moreno, D.S., Gregory, W.A. & Tanigoshi, L.H. 1984. Flight response of *Aphytis melinus* (Hymenoptera, Aphelinidae) and *Scirtothrips citri* (Thysanoptera, Thripidae) to trap color, size and shape. *Environmental Entomology*. 13, 935-940.

Mossinson, S. & Yuval, B. 2003. Regulation of sexual receptivity of female Mediterranean fruit flies: old hypotheses revisited and a new synthesis proposed. *Journal of Insect Physiology*. 49, 561-567.

Newcomer, S.D., Zeh J.A. & Zeh D.W. 1999. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96, 10236-10241.

Peixoto, A.V., Campiolo, S., Lemes, T.M., Delabie, J.H.C. & Hora, R.R. 2008. Behavior and reproductive structure of the ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera, Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 52, 88-94.

Pizzari, T. & Birkhead, T.R. 2002. The sexually-selected sperm hypothesis: sex-biased inheritance and sexual antagonism. *Biological Reviews*. 77, 183-209.

Prieto, J. 2010. A hipótese de poliandria em cochonilhas-algodão (Hemiptera; Pseudococcidae). Projecto final do Curso de Biologia, ISA-UTL, Lisboa

Radhakrishnan, P., Pérez-Staples, D., Weldon, C.W. & Taylor, P.W. 2009. Multiple mating and sperm depletion in male Queensland fruit flies: effects on female remating behaviour. *Animal Behaviour*. 78, 839-846.

Rolf, J. & Siva-Jothy, M. 2002. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. *PNAS* 99, 9916-9918

Rotundo, G. & Tremblay, E. 1976. Simple extraction and bioassay of female sex-pheromone of citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Annals of Applied Biology*. 82, 165-&.

Schlüns, E.A., Wegerner, B.J., Schlüns, H., Azuma, N., Robson S.K. & Crozier, R.H. 2009. Breeding system, colony and population structure in the weaver ant *Oecophylla smaragdina*. *Molecular Ecology*. 18, 156-167.

Shuker, D.M., Ballantyne, G.A., & Wedell, N. 2006. Variation in cost to female of the sexual conflict over mating in the seed bug, *Lygaeus equestris*. *Animal Behaviour*. 72, 313-321.

Silva E.B., Mouco J, Antunes R, Mendel Z & Franco J.C .2009. Mate location and sexual maturity of adult male mealybugs: narrow window of opportunity in a short lifetime. *IOBC wrps Bull*. 41: 3–9.

Silva, E.B. (2008) Relatório 1º triénio 2006-2008. Bolsa de Pós-Doutoramento.

Tashiro, H. & Moffitt, C. 1967. Reproduction in the California Red Scale, *Aonidiella aurantii*. Mating Behavior and Postinsemination Female Changes. Annals of the Entomological Society of America. 61, 1014-1020.

Thornhill, R. & Alcock, J. 2001. The Evolution of Insect Mating Systems. iUniverse.com, Inc., Lincoln.

Tregenza, T. & Wedell, N. 2000. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. Nature. 415, 71-73.

van Alphen, J. J. M. & M. A. Jervis. 1996. Foraging behavior. M. A. Jervis N. Kidd Insect natural enemies. Practical approach to their study and evaluation.. Chapman & Hall London. Pp. 32-36. Vet, L. M. E., Van Lenteren, J. C., Heymans, M., Meelis, M. 1983. An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insect. Physiological Entomology. 8, 97-106.

Yasui, Y. 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. Trends in Ecology & Evolution. 13, 246-250.

Zeh J.A. & Zeh D.W., 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. Animal Behaviour. 61, 1051-1063.